

EFEITOS DE CALCÓGENOQUINOLINAS NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE CISTEÍNO PROTEASES DE *Leishmania mexicana*

Juliana Fortes Di Iorio¹; Helio Alexandre Stefani²; Aline Aparecida de Souza³; Wagner Alves de Souza Júdice⁴

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: ju-fortes1@hotmail.com
2. Professor da Universidade de São Paulo; e-mail: hstefani@usp.br
3. Doutoranda em Biotecnologia, e-mail: alinesouza.sale@hotmail.com
4. Professor da Universidade Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br

Área de Conhecimento: **Enzimologia**

Palavras-chaves: Calcogenoquinolina; cisteíno proteases; *Leishmania mexicana*

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por um protozoário que possui duas formas em seu ciclo biológico, a amastigota encontrada nas células do hospedeiro e a promastigota que habita o hospedeiro invertebrado (REY, 2008). Na *Leishmania mexicana* as cisteíno proteases são mais expressas na forma amastigota de mamíferos do que na forma promastigota do vetor tornando-as alvos no desenvolvimento de drogas anti-leishmanias (MOTTRAN, 1997). Os calcogênios são compostos que contém selênio em sua estrutura e foi avaliado como um agente anti-Alzheimer (OLIVEIRA et al., 2017). O anel quinolínico está presente em diversos produtos naturais como os alcaloides. A quinolina destaca-se por suas atividades biológicas como: neuroproteção, antineoplásica, antipsicóticos e de grande importância para este trabalho, anti-tripanosomatídeo (OLIVEIRA et al., 2017).

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi a caracterização de calcogenoquinolinas com potencial atividade inibitória sobre as cisteíno proteases de tripanossomatídeos (rCPB2.8, rCPB3 e rH84Y) envolvidas como fatores da leishmaniose mexicana.

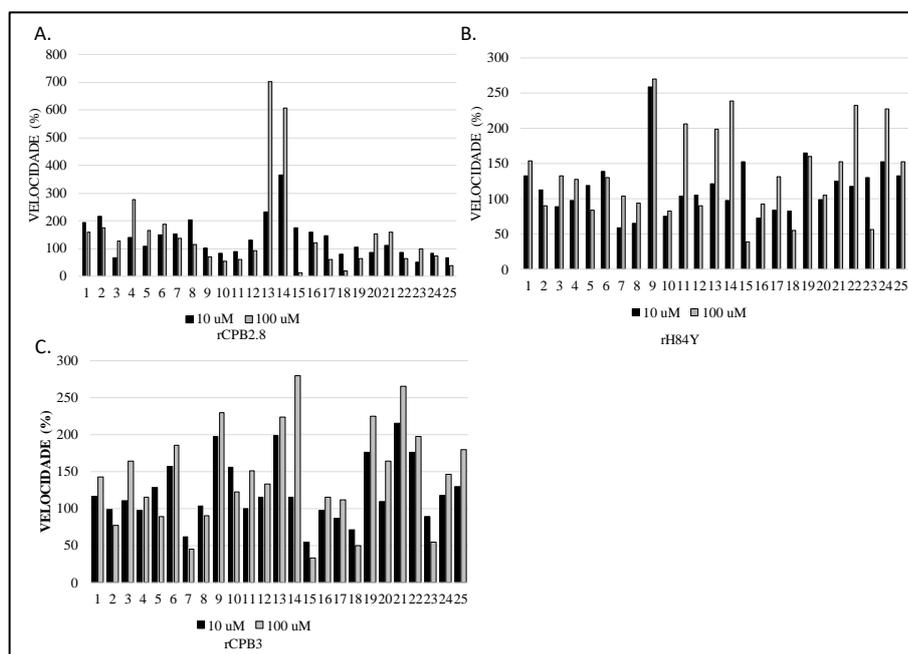
METODOLOGIA

Realizou-se a triagem em duas concentrações, 10 μ M e 100 μ M, de 25 calcogenoquinolinas. Para triagem realizou-se os ensaios enzimáticos em tampão acetato de sódio 100mM, acrescido de glicerol 20%, triton X-100 0,04%, DTT 5mM, pH 5,5 com pré-ativação por 5 min a 37°C. A atividade das enzimas foi seguida nos λ Ex=360nm e λ Em=480nm em espectrofluorímetro Hitachi-F2700, cubeta de quartzo (1mL) utilizando como substrato Z-FR-MCA. Na determinação do potencial inibitório utilizou-se concentrações crescentes dos compostos e o IC₅₀ determinado por regressão não-linear utilizando o programa Grafit 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A triagem de atividade dos compostos sobre as cisteíno proteases de *L. mexicana* mostraram que vários compostos apresentaram comportamento de ativação enzimática (FIGURA 1). Contudo esse comportamento de ativação não se repetia para todas as enzimas. Isso denota que as modificações estruturais entre as diferentes isoformas interferiram nos processos.

Figura 1 – Triagem inibitória dos compostos calcogenoquinolínicos sobre as proteases.



Experimento conduzido em duas concentrações (10 μ M e 100 μ M). Valores de velocidade em UAF/min foram convertidos em porcentagem de atividade tendo como referência a velocidade inicial na ausência de composto assumida como 100% de atividade. A) enzima rCPB2.8. B) enzima rH84Y. C) enzima rCPB3. Para a enzima rCPB2.8, FIGURA 1A, os compostos efetivos na inibição foram os 15 e 18 nas concentrações de 100 μ M, e destacaram-se os 23 e 25 em 10 μ M. Entretanto, os compostos 13 e 14 comportaram-se como ativadores enzimáticos. Para a rH84Y, FIGURA 1B, selecionou-se os compostos 7, 8, 15, 18 e 23. Novamente o composto 14 atuou como ativador, em sua estrutura há substituição do selênio pelo telúrio, o que pode ter promovido o aumento da catálise. Muitos compostos atuaram como ativadores enzimáticos da rCPB3.0 (FIGURA 1C), principalmente o 14, e os compostos que atuaram como inibidores foram os 7, 15, 18 e 23. Selecionado os compostos com melhor desempenho, determinou-se o potencial inibitório para as três enzimas, TABELA 1.

Tabela 1 – Determinação do potencial inibitório dos compostos selecionados

COMPOSTO	IC ₅₀ (μ M)		
	rCPB2.8	rH84Y	rCPB3
7	--	7,3 \pm 0,3	6,3 \pm 0,8
8	--	8,4 \pm 0,8	--
15	3,6 \pm 0,8	12,4 \pm 0,2	5,8 \pm 0,3
18	12,9 \pm 0,3	20,4 \pm 0,8	7,4 \pm 0,6
23	54,0 \pm 1,6	25,3 \pm 0,5	57,5 \pm 2,5
25	31,0 \pm 0,9	--	--

Os compostos 15, 18 e 23 foram capazes de inibir as três enzimas, no entanto, cada molécula comportou-se de maneira diferente, como o composto 15 que apresenta bom desempenho e maior efeito inibitório sobre a rCPB2.8 e rCPB3.0. Dessa forma, as substituições dos aminoácidos nas posições Asn⁶⁰, Asp⁶¹ e Asp⁶⁴ Tyr⁸⁴ foram suficientes para interferir na interação entre enzima e composto, de forma que o mesmo inibidor se comporte de diferente para cada enzima (JUDICE et al, 2005).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as calcogenoquinolinas mostraram potencial para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de sua estrutura primordial, uma vez que apresentaram capacidade de inibição das cisteíno proteases de *Leishmania mexicana*, além disso, outros estudos mostraram que esses compostos apresentam baixa toxicidade, diferente dos medicamentos utilizados atualmente. Dentre os compostos testados destacaram-se o 15, 18 e 23, por atuarem como inibidores das três enzimas. No entanto, foi observado variação na afinidade. Dessa forma, a alteração na sequência de aminoácidos foi suficiente para modificar a interação entre enzima/inibidor. Para melhor compreensão entre as interações é necessário a determinação do mecanismo de inibição, definir os valores da constante de afinidade, K_i . Prosseguindo com modelagem molecular para compreender os sítios de interação entre enzima e composto.

REFERÊNCIAS

JULIANO MA, BROOKS DR, SELZER PM, PANDOLFO HL, JUDICE WA, JULIANO L, MELDAL M, SANDERSON SJ, MOTTRAM JC, COOMBS GH. Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of *Leishmania mexicana* are mediated by a few amino acid changes. **Eur J Biochem**, 271(18), 3704-3714, 2004.

MOTTRAM JC, FRAME MJ, BROOKS DR, TETLEY L, HUTCHISON JE, SOUZA AE, et al. The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. **J Biol Chem** 272:14285–93, 1997.

OLIVEIRA, I.M.; VASCONCELOS, S.N. BARBEIRO, C.S.; CORRERA, T.C.; SHAMIN, ANWAR; PIMENTA, D.C.; CARACELLI, IGNEZ; ZUKERMAN-SCHEPTOR, JULIO; STEFANI, H.A.; MANARINF, FLÁVIA. Ytterbium(III)-Catalyzed Three-Component Reactions: Synthesis of 4-Organoselenium-quinolines and Application in Copper-free Sonogashira Cross-coupling Reactions. **New Journal of Chemistry** 02:39:43, 2017.

REY, L. **Parasitologia**. 4ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.